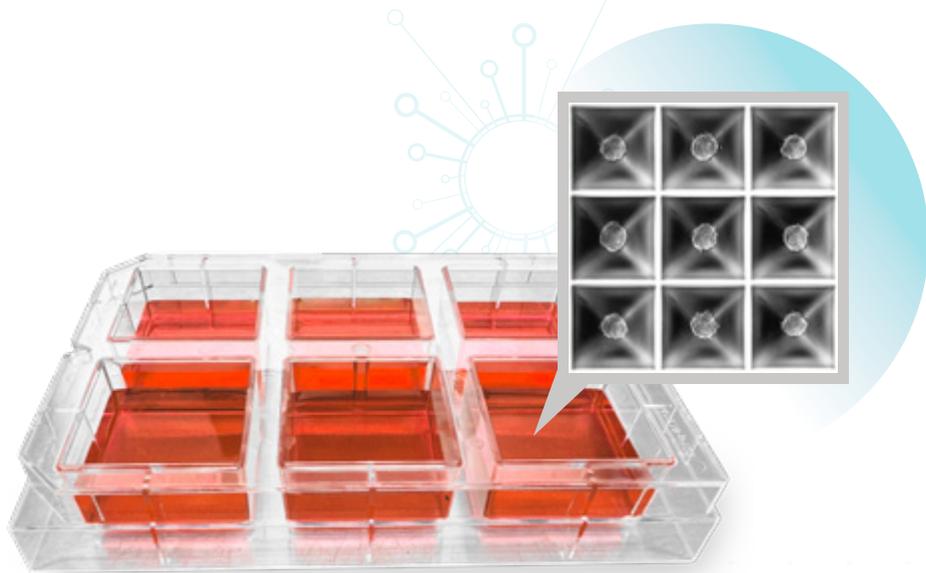


SPHERICALPLATE 5D®

Ein Ökosystem für die regenerative Medizin



- Einfach zu verwendende Plattform für die Sphäroidbildung
- Ermöglicht standardisierte und einheitlich große Sphäroide
- Praktische Hochskalierung ohne Einbußen bei der Sphäroidqualität

1 Sphericalplate 5D®, 6 Wells, je 3.364 Mikrowells =
20.184 Sphäroide

▶ TURN PIPETTING INTO PUBLISHING

SOPs für den Umgang mit der Sphericalplate 5D® (Langfassung)

Initiale Zellaussaat

- 1 Vor der Zellaussaat die funktionalisierten Wells (Mikrowells) der Sphericalplate 5D® mit 2 ml Spülmedium vorbenetzen. Beim Spülmedium kann es sich um ein Kulturmedium mit oder ohne Serumzusatz oder um einfaches PBS handeln. Nicht zulassen, dass die Mikrowells austrocknen.

Hinweis: Durch die aufgebrauchte Beschichtung fließt das Medium in der Regel überall gleichmäßig und Luftblasen werden von selbst freigesetzt. Je nach verwendetem Medium können einige Luftblasen in den Mikrowells verbleiben. Wenn dies der Fall ist, lösen sie sich in der Regel entweder durch leichtes Klopfen auf die Sphericalplate 5D® oder durch Zentrifugieren bei 1000 x g für 1 Minute. Eine visuelle Inspektion per Hellfeldmikroskopie wird empfohlen, um sicherzustellen, dass keine Blasen in den Mikrowells verbleiben.

- 2 Die gewünschte Anzahl von Zellen pro Mikrowell berechnen und die Zellen resuspendieren, wobei eine Aussaat in 1 ml Medium pro Well zu berücksichtigen ist. Das Well zuerst mit 1 ml zellfreiem Medium befüllen. Dann Ihre Zellsuspension in weiteren 1 ml Medium hinzugeben, also insgesamt 2 ml pro Well. Da die Zellen durch die Schwerkraft in die Mikrowells wandern, ist sicherzustellen, dass in kurzer Zeit eine gleichmäßig verteilte Zellsuspension entsteht. Je besser die Zellsuspension gemischt wird, desto regelmäßiger werden die Sphäroide sein.

Hinweis: Ein funktionalisiertes Well der Sphericalplate 5D® enthält 3.364 Mikrowells. Die Platte ermöglicht ein breites Spektrum an verschiedenen Größen von standardisierten Sphäroiden. Damit ein Sphäroid einen Durchmesser von 100 µm erreicht, werden im Durchschnitt 150 bis 600 Zellen pro Mikrowell benötigt. Für schnell wachsende Zellen wird eine Aussaat von weniger Zellen empfohlen, z. B. 50 Zellen pro Mikrowell. Um große Sphäroide zu erzeugen, ist es denkbar, eine größere Menge an Zellen pro Mikrowell zu verwenden, z. B. 1.500 Zellen pro Mikrowell.

Um eine einheitliche Einzelzellsuspension ohne Zellaggregation zu erhalten, wird die Verwendung eines Zellsiebs (z. B. 70 µm) vor der Aussaat empfohlen. Tumorzellen klumpen beispielsweise weniger, wenn die Zellen beim Ablösen (z. B. während des Trypsinierens) nicht durch Stöße oder Schütteln des Kolbens gestört werden.

- 3 Nach der Aussaat gemäß dem entsprechenden Standardprotokoll inkubieren. Eine weitere Zentrifugation ist nicht erforderlich.

Medienwechsel

- 4 Nach der Sphäroidbildung den Überstand vorsichtig absaugen, indem Sie die Pipette knapp unter der Oberfläche des Mediums (weg von den Sphäroiden) platzieren, um Turbulenzen zu vermeiden. Die Höhe der Mikrowells wurde so gewählt, dass die Sphäroide während des Medienwechsels gehalten werden, wobei jedoch darauf zu achten ist, dass die Sphäroide nicht aus ihrer Position heraus bewegt werden.

Hinweis: Das Pipettieren muss sehr langsam erfolgen, da sonst eine Schockwelle entstehen könnte, die die Sphäroide aus ihrem ursprünglichen Mikrowell herausdrückt und sie von einem Mikrowell in ein anderes verlagert. Dies sollte mikroskopisch überwacht werden.

Sphäroid-Ernte

- 5 Platte um 20 bis 30 Grad kippen, bevor Sie mit der Pipette in das Well eindringen. Spülen Sie das Well von oben nach unten und ernten Sie die gesamte Menge an Überstand, der die Sphäroide enthält, in einem geeigneten Behälter zur weiteren Analyse. Im Falle einer weiteren Kultivierung der Sphäroide in der Platte, vermeiden Sie es, die Platte zu kippen und führen Sie den Waschvorgang direkt durch. Beachten Sie bitte, dass es zu einem geringfügigen Verlust bei der Erntemenge kommen kann. Falls erforderlich, kann das Well weiter mit Medium gespült werden, um die restlichen Sphäroide zu ernten.

Verschiedenes

Spezifikationen der Platte: Die Sphericalplate 5D® ist eine 6-Well-Plate, von denen die Wells A1–A3 und B1–B3 mit jeweils 3.364 Mikrowells bestückt sind. Eine Platte enthält insgesamt 20.184 standardisierte Mikrowells.

Kulturbedingungen: Die Kulturbedingungen für Ihre spezifischen Zellen in der Sphericalplate 5D® müssen individuell bestimmt werden. So ist beispielsweise die Sauerstoffspannung im Medium von der Höhe des Mediums abhängig. Die Sphäroidgröße kann kritische Größen erreichen, was den Sauerstoffpartialdruck im Sphäroidkern betrifft. Die Menge des Mediums ist entsprechend an den Zellstoffwechsel in Ihrem Fall anzupassen. Ein Endvolumen von 2 ml pro Well ist ein Vorschlag für den Anfang.

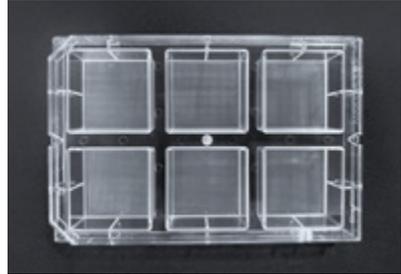


SOPs für den Umgang mit der Sphericalplate 5D®

► Schritt 1

Vorbereitung

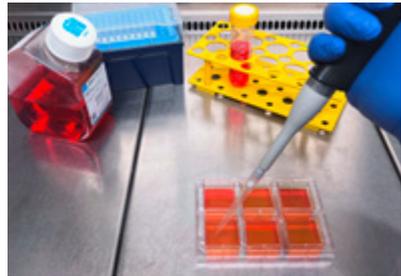
Funktionalisiertes Well mit 1 ml Medium vorbereiten



► Schritt 2

Hinzugabe von Zellen

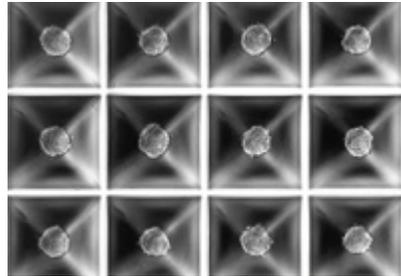
1 ml einer Einzelzell-suspension hinzugeben



► Schritt 3

Kultivierung

Inkubieren



► EINFACH IM UMGANG

Kugelmeiers Ltd.

www.kugelmeiers.com

Heidolph Instruments GmbH & Co. KG

www.heidolph.com

